

2008/1003A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

# 新世界ザルを用いたデングウイルス感染 発症動物モデル開発に関する研究

(H19-生物資源-一般-003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21 (2009) 年 3 月

研究代表者 倉 根 一 郎  
(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

# 新世界ザルを用いたデングウイルス感染 発症動物モデル開発に関する研究

(H19-生物資源-一般-003)

平成20年度 総括・分担研究報告書

平成21（2009）年3月

研究代表者 倉根一郎

（国立感染症研究所）

## 目 次

### I. 総括研究報告

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究・・・ 1

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

### II. 分担研究報告

マーモセットを用いたデング出血熱発症モデルの構築とウイルス学的検討：再感染モデルの評価・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

マーモセットを用いたデングワクチン評価系の構築とウイルス学的検討・・・・・・・・ 13

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部）

デング・タマリン実験感染モデルの臨床的、病理学的検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

研究分担者：明里宏文（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター）

新世界ザルを用いたデング熱ウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究：  
病理組織学的検索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25

研究分担者：中村伸一郎（滋賀医科大学・動物生命科学研究センター）

# I. 総括研究報告書

総括研究報告書

新世界ザルを用いたデングウイルス感染・発症動物モデル開発に関する研究

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長）

研究要旨：デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯において毎年数千万人の患者が発生していると推察されている。初年度、コモンマーモセツトはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、ワクチンや抗デングウイルス薬の評価のための動物モデルとして使用しうる可能性が示唆された。本年度は異なる血清型のデングウイルス再感染を行い、初感染ザルと比較検討をウイルス学的に行った。一定期間後の再感染に対しては感染が成立し、初感染に比べた場合に症状の悪化も認められた。また、マーモセツトのデングワクチン評価系としての有用性についても検討した。同一ウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立し、本モデルがワクチン評価系として有用であることが確認された。さらに、同じ新世界ザルでありマーモセツトに近縁のアカテタマリンを用いたデングウイルス攻撃試験を行った。アカテタマリンはデングウイルスに対してコモンマーモセツトと比較しやや低レベルながら高い感受性を持つことが明らかとなった。

研究分担者：

明里宏文（医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター 室長）

高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部 室長）

中村紳一朗（滋賀医科大学・動物生命科学研究センター 特任准教授）

A. 研究目的

デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯において毎年数千万人の患者が発生し

ていると推察されている。さらに、数十万人が致死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する。デングウイルスは、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカにより媒介されるが、近年の地球温暖化の影響によるこれら媒介昆虫の生息域拡大に伴い、温帯地域への感染拡大が懸念されている。一方、日本においても海外渡航者の増加に伴い、デングウイルスに海外渡航中に感染し、帰国後発病する輸入例が年間 100 例以上あり、診断されずに見逃されてい

る例がかなりの数におよんでいると考えられる。

デングウイルスに有効な抗ウイルス薬は未だ開発されていない。デングワクチンは現在数種類の生ワクチンが開発中であり、一部は臨床試験段階である。ワクチンや抗ウイルス剤開発に必要な感染動物モデルはいまだ開発されていない。デングウイルスの感染環は、通常ヒト-蚊-ヒトで形成されているが、ヒト以外で自然界において感受性のある動物はサルのみである。しかし、旧世界ザルにおける実験感染ではごく低レベルのウイルス血症を認めるのみであり、発熱、出血等の典型的臨床症状を呈さないことから、評価系としての疾患モデル動物としては不適當である。この問題を克服する目的で、新世界ザルであるマーモセットを用いて、デングウイルス感染・発症モデルを確立することによりデングウイルスワクチン等の評価システムを構築することを目的とした。さらに、今年度はコモンマーモセットと同じ新世界ザルでありオマキザル科に分類されるアカタマリンについてもデングウイルス接種実験を行ない、そのデングウイルスへの感受性について比較検討を行なった。

## B. 研究方法

1. ウイルス：デングウイルス1-4型臨床分離株を用いた。

2. サル：実験用サルは国内繁殖業者より購入したコモンマーモセット、アカタマリンを用い、医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター感染症施設・ABSL2区域にて飼育管理を行なった。

## 3. ウイルス感染：

1) 異なる血清型デングウイルスによる再感染

国内繁殖業者より購入したマーモセット5頭を用いて実験を行った。まず、再感染群として腹腔内に体温モニター装置（テレメーター）を挿入したマーモセット3頭にデング3型ウイルスを接種し、接種前および接種後2, 4, 7, 14日目もしくは3, 7, 14, 21日目に採血を行い、ウイルス抗原検出および抗体上昇により感染を確認した。その後、経時的採血を行いデング2型ウイルスに対する中和抗体価が1:20以下になった時点でデング2型ウイルスの再感染を行った。

2) 同一血清型デングウイルスに対する防御

マーモセット4個体に対しデング2型ウイルスを接種し、接種前および接種後3, 7, 14, 21日目に採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原量、抗体価の測定を行った。同時に血液生化学値についても検討した。さらに接種後33週目にデングウイルス2型を再接種し、接種前および接種後2, 4, 7, 14, 21日後に採血を行い血中ウイルス量、ウイルス抗原量および抗体価について検索し、同一ウイルスの再感染に対するウイルス防御能について検索を行った。

3) タマリンへのデングウイルス感染

サル攻撃接種用ウイルスとして、臨床分離株デングウイルス2型（DHF0663株）を用いた。デングウイルス2型 $10^7$ PFU/mlを、アカタマリン2頭にケタミン麻酔下で静脈内接種および皮下接種した。接種後1, 3, 5, 7日にそれぞれ採血、

7日に安楽殺を実施し組織検体を採取した。また尿および糞便を採取し、血液と共にウイルス定量や生化学検査等を行なった。血漿、尿、糞便および上記組織検体についてリアルタイム PCR 法によりウイルス定量を行なった。血中抗 Dengue 抗体は、IgM および IgG について ELISA 法により測定した。また、Dengue ウイルス抗原 NS1 蛋白を ELISA 法にて測定した。

#### 4. 病理学的検策：

メス・アカテタマリン 2 例に DENV2 を感染させ、7 日後に病理解剖を行った。オス・マーモセット 2 例に DENV2 を接種、さらに 6 ヶ月後に DENV2 を再接種、その 7 日後に病理解剖を行った。それぞれの各主要臓器をホルマリン固定またはパラホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋材料を作製し、HE 染色を行った。DENV に対する免疫染色の一次抗体として、抗 DENV 3B 抗体、抗 DENV D1-11 抗体、(以上マウス・モノクローナル抗体)、抗 DENV SQ93-2239 抗体 (ウサギ・ポリクローナル抗体) を用いて酵素抗体法を行った。また FITC 標識抗 DENV HB-112 抗体を用いて直接蛍光抗体法を行った。

#### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、国立感染症研究所、医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査を受けその承認を得て行った。

### C. 研究結果

1. 異なる血清型の Dengue ウイルスによる再感染

Dengue 2 型ウイルス初感染群においては  $8.6 \times 10^6$  copies/ml 以上のウイルス RNA が接種 3 日目に検出された。また、どちらの個体からも尿中からウイルス RNA が検出され長いもので接種後 12 日目まで検出された個体も確認された。一方、再感染群においては  $1.4 \times 10^6$  copies/ml のウイルスが接種 3 日目をピークとして検出され、7 日目にも検出される個体もあった。再感染群では活動量の低下は認められなかったものの、すべての個体で初感染群よりも顕著な発熱が認められた。

2. 同一血清型の Dengue ウイルスに対する防御

Dengue 2 型ウイルスの初感染においては 4 個体全てにおいて  $6 \times 10^6$  copies/ml 以上のウイルス RNA が接種後 3 日目をピークとして検出された。また、4 個体中 3 個体の尿中からウイルス RNA が検出され、個体によっては接種 14 日目の尿中からもウイルス RNA が検出された。Dengue 2 型ウイルスの再感染では、すべての個体に  $1.8 \times 10^5$  pfu/animal のウイルスを接種したが、全ての個体のいずれの時期においても血中および尿中からウイルス RNA は検出されなかった。同様に、NS1 抗原に関しても全ての個体でまったく検出されなかった。

3. タマリンへの Dengue ウイルス感染

昨年度報告した Dengue ウイルス 2 型 (DHF0663 株) 接種コモンマーモセットにおける血漿中ウイルス RNA 量は、ピーク時平均  $2 \times 10^8$  copies/ml であったのに比べ、アカテタマリンでは 1/10-1/100 程度であった。抗 Dengue 抗体価について測定したところ、IgM 抗体価は、#11 では上

昇の度合いは低かったが、#17ではDay=3以降から高い上昇がみられた。IgG抗体価についても、同様に#17個体において、Day=3以降から上昇していた。血液の生化学検査を行ったところ、特に腎臓機能の低下を示唆するBUN値の上昇が見られた。

#### 4. 病理学的検策

2例のアカテタマリンはともに脾臓、肝臓で背景病変と考えられる髄外造血が認められた。また一例は脾臓で白脾髄の大型化が認められた。明確な炎症などは確認されなかった。一方、2回DENV2を感染させた2例のコモンマーモセットは、空腸の絨毛の伸張と固有層での中等度のリンパ球浸潤を認めた。しかし炎症などの明らかな破壊性病変は見られなかった。

#### D. 考察

これまでの研究からマーモセットがデングウイルス感染症のモデル動物として有用であることが明らかとなった。異なる血清型のデングウイルスによる再感染群では初感染群に比べ、有意な発熱、白血球減少、肝酵素の上昇等が見られたことからデングウイルス感染に伴う出血熱様症状等、重篤症状を誘発する要因の一つとしてHeterotype virusの再感染が関与する可能性が示唆された。今後、様々な条件下におけるウイルス感染実験を行うことによりデング出血熱様症状の誘導を行い、出血熱様症状発症のメカニズムを明らかにすると共に、デング出血熱発症モデルを確立することで今後の治療薬開発等の発展に大きく寄与すると考えられ

た。

さらに、マーモセットのデングワクチン評価系として有用性について評価を行った。これまでのワクチンに関する研究は主にカニクイザル等の旧世界ザルを用いて行われていたが、その感受性は低くまた特に症状も示さないためモデルとしての利用範囲は限られていた。デングウイルス感染マーモセットに対し同一ウイルスの再感染実験を行った結果、感染が成立せず同一ウイルスの再感染に対しては防御が誘導されることが明らかになった。また、初感染においては白血球減少や肝および腎酵素の上昇などの検査所見が確認されたが再感染ではそれらが確認されなかった。従って、初感染により誘導された中和抗体がデングウイルス感染の防御に有効であることが示された。以上の結果は、デングウイルス感染に対する防御に中和抗体が有効であることを改めて示すものであり、またマーモセットがワクチン評価系として有用であることを示すものである。

一方、デングウイルス攻撃接種アカテタマリンにおいて、①血漿中に比較的高いレベルのウイルスRNAが検出された、②血中ウイルス量の低下と平行して、特に静脈内ウイルス接種個体(#17)においてIgMおよびIgG抗体価の上昇とウイルス抗原NS1蛋白質量の顕著な上昇が認められた、③マーモセットでは認められた血尿や肉眼的異常を伴う腎臓への強い障害は認められなかったが、BUN値の上昇により感染7日目以降に腎臓疾患が誘発される可能性が示唆された。これらのことから、アカテタマリンはコモンマーモセッ



トよりやや弱いもののデングウイルスに感受性を有し、またウイルス接種方法として静脈内接種が有効であることが示された。

#### E. 結論

コモンマーモセットはデングウイルスに対して非常に感受性が高く、感染後高いレベルのウイルス血症を示す。異なる血清型のデングウイルス再感染においては感染が成立し、初感染に比した場合に症状の悪化も認められた。一方、同一ウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立し、本モデルがワクチン評価系として有用であることが確認された。さらに、マーモセットに近縁のアカテタマリンはデングウイルスに対してコモンマーモセットと比較しやや低レベルながら高い感受性を有していた。

#### F. 健康危機管理情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会等発表

###### 1) 国際学会

なし

###### 2) 国内学会

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一朗、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎：マーモセットを用いたデングウイルス感染モデルの構築，第56回日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成20年10月26日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

明里宏文、高崎智彦、倉根一郎：デングウイルス検査方法及びモデル動物（特願2008-35178）

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

分担研究報告書

マーマセットを用いたデング出血熱発症モデルの構築とウイルス学的検討

— 再感染モデルの評価 —

研究代表者：倉根一郎（国立感染症研究所・ウイルス第一部・部長）

研究協力者：大松 勉（国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官）

研究要旨：

デング熱・デング出血熱は毎年数千万人の患者が発生し、さらに数十万人が致死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する公衆衛生上重要な節足動物媒介性ウイルス感染症の一つである。しかし、デング出血熱の有用な動物モデルが存在しないため、その発症メカニズムは未だに不明である。我々のこれまでの研究により、マーマセットがデングウイルスに高い感受性を有し、時に臨床症状を呈することが明らかになった。そこで、本年度はデング出血熱発症モデルの構築を目的として、既感染マーマセットへHeterotype virusの再感染を行い、初感染ザルと比較検討をウイルス学的に行った。その結果、一定期間後の再感染に対しては感染が成立し、初感染に比べた場合に症状の悪化も認められた。従って、マーマセットはデング出血熱発症モデルとしての可能性も有しており、今後、デング出血熱発症モデルの確立を目指し、それを用いて出血熱様症状発症のメカニズムを明らかにしていく。

A. 研究目的：

デング熱・デング出血熱は熱帯・亜熱帯において毎年数千万人の患者が発生していると推察されている。さらに、数十万人が致死率の高い出血熱・ショック症候群を呈する。年々発生報告数は増加しており、我が国においても海外渡航者が帰国後発症する輸入症例として2008年には100例を超えている。また地球温暖化の影響に伴い媒

介蚊であるネッタイシマカやヒトスジシマカの生息域の拡大も報告されており、流行地域の拡大が懸念されている。このように節足動物媒介性ウイルス感染症の中で公衆衛生上重要な感染症の一つであるにもかかわらず出血熱様症状発症のメカニズムは分かっておらず、その治療法は対症療法のみである。デングウイルスの感染環は通常ヒト・蚊・ヒトで形成されており、自然界に

おけるヒト以外の感受性のある動物はサルのみである。しかし、旧世界ザルにおいてはごく低レベルのウイルス血症を認めるのみで、発熱や出血などの臨床症状を呈さない事から、出血熱様症状発症メカニズムの解明を行う上ではモデルとして理想的ではない。我々のこれまでの研究により、新世界ザルに属するコモンマーモセットがデングウイルスに対して高い感受性を有することが明らかとなり、また一部の個体では肉眼的血尿等の臨床症状も確認された事からマーモセットがデング出血熱発症モデル動物として抗ウイルス薬やワクチンの評価に利用可能であることが示唆された。そこで本年度はマーモセットを用いたデング出血熱発症モデルの構築を目的として、異なる2つの型のデングウイルス再感染を行いウイルス学的検索およびその臨床症状について検索を行った。

## B. 研究方法

国内繁殖業者より購入したマーモセット5頭を用いて実験を行った。まず、再感染群として腹腔内に体温モニター装置（テレメーター）を挿入したマーモセット3頭にデング3型ウイルスを接種し、接種前および接種後2, 4, 7, 14日目もしくは3, 7, 14, 21日目に採血を行い、ウイルス抗原検出および抗体上昇により感染を確認した。その後、経時的採血を行いデング2型ウイルスに対する中和抗体価が1:20以下になった時点でデング2型ウイルスの再感染を行った。デング2型ウイルス接種前およびウイルス接種後3, 7, 14, 21日目に採血し、血中ウイルス量、抗体価について検索すると共に、血液検査を実施し末梢血液像及び

生化学値について検索した。同時に尿中からのウイルスRNA検出も試みた。また、初感染群として新たに腹腔内にテレメーターを挿入したマーモセット2頭に対してデング2型ウイルスを接種し、接種前及び接種後3, 7, 14, 21日目に採血を行い、再感染群と同様な検索を行い比較検討した。

使用ウイルスとして、デング3型ウイルス野外分離株 ( $4.5 \times 10^6$  pfu/animal) およびデング2型ウイルス野外分離株 ( $4.4 \times 10^7$  pfu/animal) を接種した。血中ウイルス量は血漿よりRNAを抽出しTaqMan RT-PCR法を用いてウイルスRNA量を測定した。血中デングウイルス特異的IgM抗体およびデングウイルスIgG抗体価の測定はIgM捕捉ELISAおよびIgG ELISAを用いて行った。また、体温変動及び活動量の変化は腹腔内に挿入したテレメーターを用いて検索した。

本研究は、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を受け、その承認を受け医薬基盤研究所筑波霊長類医学科学研究センター内の感染症実験施設内で実施した。

## C. 研究結果

デング2型ウイルス初感染群においては  $8.6 \times 10^6$  copies/ml以上のウイルスRNAが接種3日目に検出された。また、どちらの個体からも尿中からウイルスRNAが検出され長いもので接種後12日目まで検出された個体も確認された。一方、再感染群においては  $1.4 \times 10^6$  copies/mlのウイルスが接種3日目をピークとして検出され、7日目にも検出される個体もあった。デング2型ウイルス初感染群2頭と再感染群3頭の血中抗体価の推移を検索したところ、

DENV-specific IgM 抗体は全ての個体で接種 7 日目から上昇し、初感染群では 14 日目をピークとした上昇が確認された。再感染群 3 頭のうち 2 頭は 14 日目をピークに、1 頭は 21 日目まで上昇が確認されたが、その抗体価は初感染群に比べ低いものであった。一方、DENV-specific IgG 抗体は初感染群において接種後 14 日目から上昇が確認されたが、再感染群では 3 個体中 2 個体で接種 7 日目から、残りの 1 頭も接種 14 日目から上昇が確認され、その抗体価は初感染に比べ高いものであった。

初感染群と再感染群で臨床症状の比較を行ったところ、初感染群においては接種後の活動量の低下が 2 個体で確認され、また 2 個体中 1 個体で発熱が確認された。一方、再感染群では活動量の低下は認められなかったものの、すべての個体で初感染群よりも顕著な発熱が認められた。さらに、血液検査所見の結果から白血球減少が初感染群、再感染群全ての個体で認められた。また、初感染群では GDP や LDH の上昇が各 1 個体で認められ、白血球減少も 1 個体で見られたが、再感染群 3 個体のうち 2 個体では複数の酵素の上昇が確認され、そのうち 1 個体では血小板減少も認められた。

#### D. 考察

我々のこれまでの研究からマーマセツトがデングウイルス感染症のモデル動物として有用であることが明らかとしたが、本研究結果からマーマセツトがデング出血熱発症モデルとしての可能性も有することが示唆された。再感染群においては DENV-specific IgM 抗体は上昇が認められるものの初感染群に比べ低い誘導であった。

一方、IgG 抗体については初感染群に比べ抗体上昇が迅速かつ高いものであった。しかし、どちらの群においてもほぼ同程度のウイルス血症が確認されていたことから、Heterotype virus の感染に対する交差免疫は一定期間で減弱し再感染が成立することが実験的に証明された。さらに、再感染群では初感染群に比べ、有意な発熱、白血球減少、肝酵素の上昇等が見られたことからデングウイルス感染に伴う出血熱様症状等、重篤症状を誘発する要因の一つとして Heterotype virus の再感染が関与する可能性が示唆された。今後、様々な条件下におけるウイルス感染実験を行うことによりデング出血熱様症状の誘導を行い、出血熱様症状発症のメカニズムを明らかにすると共に、デング出血熱発症モデルを確立することで今後の治療薬開発等の発展に大きく寄与すると考えられた。

#### E. 結論

マーマセツトに対する一定期間後の Heterotype virus 再接種は感染が成立すると共に、初感染に比べ症状が悪化する傾向が見られた。本モデルはデング出血熱発症モデルとしての可能性も有することが明らかとなった。

#### G. 研究発表

##### 1. 学会発表

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一朗、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎

マーマセツトを用いたデングウイルス感染モデルの構築

第56回日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成20年10月26日

2. 論文発表  
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況  
明里宏文、高崎智彦、倉根一朗：デングウイルス検査方法及びモデル動物（特願2008-35178）

Table 1 血中ウイルスRNA量の推移

実験	ID	days post inoculation (copies/ml)					
		0	3	7	14		
再感染群	#1	-	5.2E+06	3.2E+04	-	-	-
	#2	-	1.4E+06	-	-	-	-
	#3	-	2.7E+06	8.1E+03	-	-	-
初感染群	#4	-	1.2E+07	-	-	-	-
	#5	-	8.6E+06	-	-	-	-

-: undetected

Table 2 尿中ウイルスRNA量の推移

実験	ID	days post inoculation (copies/ml)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
再感染群	#1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.6E+06	-	-	-	-
	#2	-	-	-	2.6E+04	-	-	2.5E+05	-	-	5.8E+04	-	-	-	1.4E+04
	#3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.4E+05	-	7.8E+04	-	-
初感染群	#4	-	8.3E+04	-	-	-	-	2.9E+05	1.8E+05	-	-	-	8.1E+04	-	-
	#5	-	-	7.3E+04	-	6.6E+04	7.1E+04	1.5E+05	-	4.8E+05	-	-	-	-	-

-: undetected

Table 3 初感染群および再感染群における臨床症状および血液検査所見

実験	ID	臨床症状				血液検査所見			
		体温変動	活動量低下	血小板減少	白血球減少	GOT	GDP	LDH	BUN
再感染群	#1	++	-	+	++	+	+	+	+
	#2	++	-	-	+	+	+	-	-
	#3	++	-	-	++	-	-	-	-
初感染群	#4	+	+	+	+	-	+	-	-
	#5	-	+	-	+	-	-	+	-

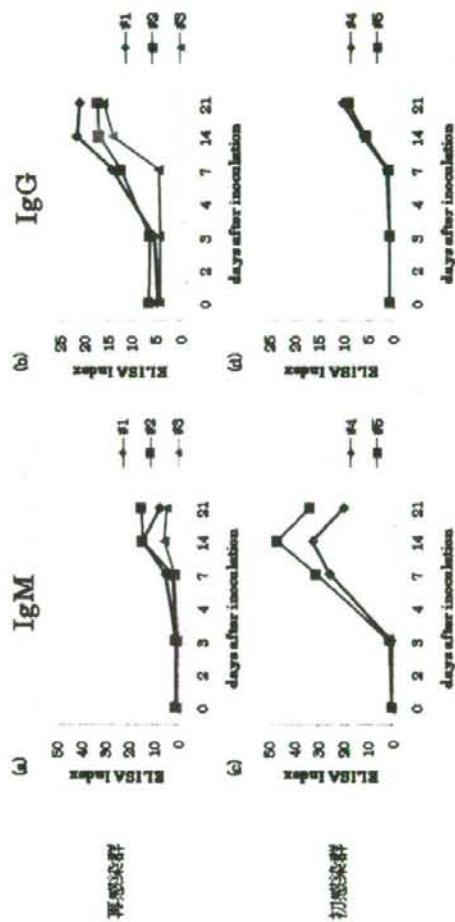


Fig. 1 再感染及び初感染群におけるDENV-specific IgM抗体およびIgG抗体の増多  
 (a), (c) DENV-specific IgM抗体の推移, (b), (d) DENV-specific IgG抗体の推移, (a), (b) 再感染群, (c), (d) 初感染群



分担研究報告書

マーモセットを用いたデングワクチン評価系の構築とウイルス学的検討

研究分担者：高崎智彦（国立感染症研究所・ウイルス第一部・室長）

研究協力者：大松 勉（国立感染症研究所・ウイルス第一部・研究官）

研究要旨：

デングウイルスに対するワクチンは様々なものが開発段階にあるが実用化に至ってはいない。その要因の一つとしてワクチンの有効性を評価するモデル動物の欠如が挙げられる。これまで霊長類を中心としてさまざまな動物種を用いた評価は行われてきたものの利用可能なモデル動物はなく、カンクイザルを含めた旧世界ザルは感受性が低く症状も呈さなかった。我々はこれまでに、新世界ザルのコモンマーモセットがデングウイルスに対して高い感受性を示すことを明らかにしてきた。本年度はマーモセットのデングワクチン評価系としての有用性について検索を行った。その結果、同一ウイルスの再感染に対しては完全に防御が成立し、本モデルがワクチン評価系として有用であることが確認された。

A. 研究目的：

デングウイルス感染によるデング熱・出血熱は熱帯・亜熱帯を中心に年間数千万人が罹患し、数十万人がデング出血熱を発症するという節足動物媒介性ウイルス感染症である。我が国においても輸入症例として2008年は100例を超える患者が報告されている。しかし、有効な治療薬はなく、ワクチンは開発途上にあるためその実用化は急務となっている。治療薬やワクチンの開発には適切なモデル動物が必須であり様々な動物種を用いたモデルの構築が試みられてきたが適した自然動物種はなく、特にマ

カク属のサルではウイルス血症は低く症状も示さないためモデル動物としては不十分であった。本研究においては、これまでマーモセット属コモンマーモセットが全ての型のデングウイルスに対して感受性を有することを明らかにしてきた。そこで本年度はマーモセットを用いたワクチン評価系モデルの確立を目的として、デング2型ウイルス感染個体に対するデング2型ウイルス再感染実験を行い評価モデルとしての有用性を明らかにした。

## B. 研究方法

正常マウスマウス 4 個体に対し Dengue 2 型ウイルスを接種し、接種前および接種後 3, 7, 14, 21 日目に採血を行い、血中ウイルス量、ウイルス抗原量、抗体価の測定を行った。同時に血液生化学値についても検討した。さらに接種後 33 週目に Dengue 2 型を再接種し、接種前および接種後 2, 4, 7, 14, 21 日後に採血を行い血中ウイルス量、ウイルス抗原量および抗体価について検索し、同一ウイルスの再感染に対するウイルス防御能について検索を行った。また、同時に血液生化学検査も行った。使用したウイルスは Dengue 2 型ウイルス野外分離株で、初回接種には  $4.4 \times 10^7$  pfu/animal,  $1.8 \times 10^6$  pfu/animal のウイルスを各 2 個体ずつ、再接種では全ての個体に  $1.8 \times 10^6$  pfu/animal のウイルスを接種した。血中ウイルス量は TaqMan RT-PCR 法を用いて RNA 量の定量を行い、ウイルス抗原量、血中 Dengue 2 型ウイルス特異的 IgM 抗体および抗 Dengue 2 型ウイルス IgG 抗体価の測定は NS1 抗原検出 ELISA、IgM capture ELISA および IgG Indirect ELISA を用いて行った。また、同時に尿中からもウイルス RNA の検出を試みた。

本研究は、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査を受け、その承認を受け医薬基盤研究所筑波霊長類医科学研究センター内の感染症実験施設内で実施した。

## C. 結果

Dengue 2 型ウイルスの初感染においては 4 個体全てにおいて  $6 \times 10^6$  copies/ml 以上のウイルス RNA が接種後 3 日目をピークとして検出された。また、4 個体中 3 個体

の尿中からウイルス RNA が検出され、個体によっては接種 14 日目の尿中からもウイルス RNA が検出された。NS1 抗原は体内で Dengue 2 型ウイルスが感染・増殖した場合に感染細胞から放出される非構造蛋白質であり、その存在は体内でのウイルス増殖の指標ともなり得るものである。 $10^7$  pfu/animal 接種群では接種 3 日目をピークとして 7 日目まで NS1 抗原が検出されていたが、 $10^6$  pfu/animal 接種群では 3 日目から検出され 7 日目をピークとして検出された。DENV-specific IgM 抗体については接種 7 日目から 14 日目をピークとして検出され、DENV-specific IgG 抗体は接種後 14 日目から検出された。さらに血液検査の結果から、すべての個体で白血球減少が確認され、肝酵素、腎酵素の上昇などが確認される個体が見られた。

Dengue 2 型ウイルスの再感染では、すべての個体に  $1.8 \times 10^6$  pfu/animal のウイルスを接種したが、全ての個体のいずれの時期においても血中および尿中からウイルス RNA は検出されなかった。同様に、NS1 抗原に関しても全ての個体でまったく検出されなかった。Dengue 2 型ウイルス特異的 IgM 抗体については 4 個体中 3 個体で優位な上昇は確認されなかったが、1 個体でわずかな上昇がみられた。抗 Dengue 2 型ウイルス IgG 抗体については 4 個体中 3 個体で接種 7 日目から上昇し、接種 15 日目にピークが見られた。残りの 1 個体では接種 21 日目まで上昇していた。また、IgM 抗体の上昇がみられた個体は IgG 抗体価が比較的低い個体であった。血液検査の結果から、血球値および各生化学値の優位な変化はほとんど確認されなかった。

#### D. 考察

本研究では、デングウイルスに高い感受性を示すマーモセットのデングワクチン評価系として有用性について評価を行った。これまでのワクチンに関する研究は主にカニクイザル等の旧世界ザルを用いて行われていたが、その感受性は低くまた特に症状も示さないためモデルとしての利用範囲は限られていた。本実験においてデングウイルス感染マーモセットに対し同一ウイルスの再感染実験を行った結果、感染が成立せず同一ウイルスの再感染に対しては防御が誘導されることが明らかになった。また、初感染においては白血球減少や肝および腎酵素の上昇などの検査所見が確認されたが再感染ではそれらが確認されなかった。従って、初感染により誘導された中和抗体がデングウイルス感染の防御に有効であることが示された。以上の結果は、デングウイルス感染に対する防御に中和抗体が有効であることを改めて示すものであり、またマーモセットがワクチン評価系として有用であることを示すものである。現在、開発途上にあるワクチンの一部は子供を対象とした臨床段階へと進んでいるが、その安全性や有効性の評価には適切な実験動物を用いた評価が不可欠である。マーモセットを用いたデングウイルス評価系は今後のワク

チン開発を進展させるものとなると考える。

#### E. 結論

本研究において、デングウイルスに対する中和抗体が感染防御に対して有効であることを改めて示すと共に、マーモセット-デングウイルス感染モデルがワクチン評価系として有効であることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 学会発表

大松勉、平山隆則、小滝徹、伊藤美佳子、片貝祐子、中村紳一郎、明里宏文、高崎智彦、倉根一郎

マーモセットを用いたデングウイルス感染モデルの構築

第56回日本ウイルス学会学術集会（岡山）平成20年10月26日

##### 2. 論文発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

明里宏文、高崎智彦、倉根一郎：デングウイルス検査方法及びモデル動物（特願2008-35178）

Table 1 血中ウイルスRNA量の経時変化

実験	ID	days post inoculation (copies/ml)						
		0	1	2	3	4	5	7
初感染	#1	-	NT	NT	1.2E+07	NT	NT	-
	#2	-	NT	NT	8.6E+06	NT	NT	-
	#3	-	NT	NT	6.1E+06	NT	NT	-
	#4	-	NT	NT	9.5E+06	NT	NT	3.6E+05
再感染	#1	-	NT	-	NT	-	NT	-
	#2	-	NT	-	NT	-	NT	-
	#3	-	NT	-	NT	-	NT	-
	#4	-	NT	-	NT	-	NT	-

-: Undetected

NT:Not tested

Table 2 尿中ウイルスRNA量の経時変化

実験	ID	days post-inoculation (copies/ml)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
初感染	#1	-	8.3E+04	-	-	-	-	2.9E+05	1.8E+05	-	-	-	8.1E+04	-	-
	#2	-	-	7.3E+04	-	6.6E+04	7.1E+04	1.5E+05	-	4.8E+05	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	1.4E+05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.0E+05
	#4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
再感染	#1	-	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	NT	NT	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-
	#4	-	-	-	-	NT	-	-	NT	NT	-	-	-	-	-

-: Undetected

NT:Not tested

Table 3 血液検査所見の変化

実験	ID	血小板減少	白血球減少	GOT	GDP	LDH	BUN
初感染	#1	+	+	-	+	-	-
	#2	-	+	-	-	+	-
	#3	-	+	+	+	-	-
	#4	+	+	+	+	-	+
再感染	#1	-	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	-	-
	#3	-	-	-	-	-	-
	#4	-	-	+	-	-	-

+:変化有

-:変化なし